

ATENT COOPERATION TF TY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year)
15 May 2000 (15.05.00)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

International application No.
PCT/DE99/02715

Applicant's or agent's file reference
9961

International filing date (day/month/year)
27 August 1999 (27.08.99)

Priority date (day/month/year)
28 August 1998 (28.08.98)

Applicant

KOEHLER, Thomas

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

27 March 2000 (27.03.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Christelle Croci

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

*REVIEWED
APR 30 2001*

Claims

1. Reaction chambers coated with native, synthetically or enzymatically prepared nucleic acids, **characterized in that** the coating ensues in a non-covalent manner on chemically or biochemically non-modified surfaces of the inner walls of reaction chambers.
2. Reaction chambers according to claim 1, **characterized in that** they are comprised of glass or plastic chambers or of glass capillaries coated with native, synthetic or partially synthetic nucleic acids (DNA, RNA, synthetic equivalents of DNA and/or RNA, dU-containing DNA).
3. Method for the production of reaction chambers according to claims 1 and 2 using standard nucleic acids, **characterized in that** defined quantities of solved native, synthetic or partially synthetic nucleic acids (DNA, RNA, synthetic equivalents of DNA and/or RNA, dU-containing DNA) are directly aliquoted into reaction chambers suitable for enzymatic amplification, and in that the nucleic acid is subsequently non-covalently adsorbed directly in the inner wall of the reaction chamber by mild lyophilization of the sample.
4. Method according to claim 3, **characterized in that** chambers or glass capillaries are coated.
5. Method according to claims 3 and 4, **characterized in that** defined stock solutions of the nucleic acids to be adsorbed are precisely calibrated by means of an appropriate analytical technique prior to being used for the preparation of nucleic acid dilution stages used for coating.
6. Method according to claims 3 through 5, **characterized in that**, during the lyophilization process, a defined quantity of a specific carrier nucleic acid is admixed to the standard nucleic acids to be adsorbed, said specific carrier nucleic

acid having been transferred into fragments of a mean length of about 1 - 2 kb beforehand by means of a physical process (e.g. ultrasonic treatment), or said carrier nucleic acid being used unmodified, and which exhibits a sequence homology to the nucleic acid sequence to be detected, which is as minimal as possible.

- 5 7. Method according to claims 3 through 6, **characterized in that** the DNA of lambda phages or of E. coli tRNA is used.
- 10 8. Method according to claims 3 through 7, **characterized in that** corresponding reaction chambers are coated simultaneously with a plurality (at least two) of different analyte sequence-specific calibrated nucleic acids, if necessary of different cellular or organic origin or originating from different species.
- 15 9. Method according to claims 3 through 8, **characterized in that** the coating of at least 96 reaction chambers arranged in a microtiter format ensues with at least 12 x 8 sequence-specific standard nucleic acids of decreasing concentrations covering the entire physiological or technological concentration range of the analyte nucleic acid to be measured (highest concentration: A1 -12, lowest concentration: H1 - 12).
- 20 10. Method according to claims 3 through 9, **characterized in that** the coated reaction chambers are closed standing upright in an appropriate carrier box receiving at least 96 vessels.
- 25 11. Method according to claims 3 through 10, wherein, apart from the calibrated nucleic acids, at least two specific marked or unmarked oligonucleotides acting as primers or probes, the carrier nucleic acid and further reaction components required for the enzymatic amplification are contained in the reaction chambers in a lyophilized form, or specifically marked or unmarked oligonucleotides acting as primers or probes, the carrier nucleic acid and further reaction components

required for the enzymatic amplification are contained in separate vessels without nucleic acid standard in a lyophilized form.

12. Use of the reaction chambers coated with nucleic acids according to claims 1
5 through 11 in test kits for the detection of selected nucleic acids in biological substances.
13. Use according to claim 12, **characterized in that** said test kits are comprised of at
10 least one ZeptoStrip (octet strip of closed reaction chambers coated with eight different nucleic acid concentrations) closed with a film / foil, of at least two oligonucleotides as well as one carrier nucleic acid.

4/PA/T5

09/786072

US Rec'd PCT/PTO 26 FEB 2001

Mit Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsräume, Verfahren zu ihrer Herstellung und
ihre Verwendung

5 **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft mit Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsgefäße, Verfahren zu ihrer Herstellung durch die Beschichtung der Gefäße mit Standard-Nukleinsäuren, einen Testkit, enthaltend einen Standard-Strip, hergestellt unter Verwendung des erfindungsgemäßen 10 Verfahrens, einen Satz von mindestens 2 Oligonukleotiden, die hierfür geeignet sind, einer Träger-Nukleinsäure sowie eine Vielzahl von Verwendungsmöglichkeiten des Verfahrens für den quantitativen Nachweis ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen.

Viele Bereiche in der klinischen Forschung und Diagnostik, der pharmakologischen 15 Wirkstoffprüfung sowie der Lebensmittelanalytik machen es erforderlich, Konzentrationen bestimmter Nukleinsäuren (Desoxyribonukleinsäure [DNA]- oder Ribonukleinsäure [RNA]) in einer zu analysierenden Probe genau zu kennen. Zur Messung insbesondere extrem geringer Analytkonzentrationen kommen häufig enzymatische Amplifizierungsverfahren zum Einsatz. Hierbei handelt es sich u.a. um die Verfahren Polymerasekettenreaktion (PCR, US Patente 20 4.683.195, 4.683.202, EP 0 200 362, EP 0 201 184; Hoffmann-La Roche), Ligasekettenreaktion (LCR, Abbott Diagnostics, North Chicago, IL, USA), Strand Displacement Amplification (SDA, Walker et. al. [1993], PCR Methods Appl. 3: 1-6, Becton-Dickinson Research Center) und Transcription-Mediated Amplification (TMA, Gen-Probe Inc., San Diego, CA), mit deren Hilfe bei extrem hoher Sensitivität Analytnukleinsäure-Konzentrationen 25 gemessen werden können. Voraussetzung für den quantitativen Einsatz aller aufgeführten Technologien ist die Verfügbarkeit geeigneter synthetischer oder nativer Nukleinsäure-Standards exakt definierter Konzentration, die entweder als externe, d.h. in parallelen Ansätzen amplifizierte, oder interne Standards (d.h. simultan im selben Ansatz amplifizierte sog. Kompetitoren) verwendet werden. Während die Herstellung geeigneter Standards dem 30 Fachmann bekannt ist (Zimmermann und Mannhalter 1996, Biotechniques 21: 268-279, Köhler et al. 1995, Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction - Nonradioactive PCR methods. Heidelberg, Springer-Verlag), bestehen bislang ungelöste verfahrenstechnische Probleme bei der Überführung dieser Standards in eine anwendungsbereite und stabile Form,

welches eine Grundvoraussetzung für die reproduzierbare Messung unbekannter Nukleinsäurekonzentrationen ist. Insbesondere bestehen Probleme bei der optimalen Lagerung hoch-verdünnter Nukleinsäuren. Diese beruhen im wesentlichen darauf, daß in der Praxis meist mit extrem niedrig konzentrierten Standard-Verdünnungsreihen gearbeitet wird (ca. 1 - 100000 Moleküle pro Reaktionsansatz), die trotz Lagerung bei Temperaturen zwischen -20°C und -80°C häufig instabil sind (Köhler et al. 1997, BioTechniques 23: 722-726). Diesem Problem wird u.a. so begegnet, daß niedrig-konzentrierte Nukleinsäure-Verdünnungen in der Form stabilisiert werden, daß der Verdünnung eine definierte Menge einer spezifischen Träger-Nukleinsäure zugesetzt wird, welche der zu detektierenden Nukleinsäuresequenz eine möglichst minimale Sequenzhomologie aufweist (De Kant et al. 1994, Biotechniques 17: 934-942, Köhler et al. 1997, BioTechniques 23: 722-726). Dies führt aber nicht immer zum Erfolg (siehe Figur 1), so daß allgemein empfohlen wird, alle erforderlichen Verdünnungsschritte ausgehend von einer Stammlösung definierter Konzentration täglich neu durchzuführen. Dies wiederum ist aber mit dem Nachteil verbunden, daß die eingesetzten Standards arbeitsintensiv hergestellt werden müssen, variierender Pipettiergenauigkeit unterliegen und kostbare, verdünnte Chargen nur teilweise verbraucht werden können. Somit erhöhen sich zwangsläufig Kosten und Zeitaufwand bei gleichzeitig verringelter Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Methodik. Anwendungstechnisch gesehen ist die geschilderte Verfahrensweise somit unökonomisch, mehreren Störgrößen unterworfen und demzufolge für diagnostische Routineabläufe ungeeignet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Gefäße und Methoden zu entwickeln, mit denen die oben erwähnten Nachteile der Verfahren gemäß dem Stand der Technik vermieden werden können und die einfach in der Anwendung, über einen längeren Zeitraum bei gleichbleibender Qualität lagerbar und Bestandteile von Testkits sein können.

Die Aufgabe wurde durch die Beschichtung von Reaktionsräumen mit definierten Standard-Nukleinsäurekonzentrationen gelöst, welches folgende Teilschritte enthält:

- Herstellung und Reinigung geeigneter adsorbierbarer Nukleinsäure-Standards
- Bestimmung der exakten Konzentration des Produktes mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC), nachfolgend Kalibrierung genannt
- Herstellung einer Verdünnungsreihe aus dem kalibrierten Standard unter Zusatz definierter Mengen einer Träger-Nukleinsäure
- erfindungsgemäße Adsorption der Standard/Träger-nukleinsäuregemische an für enzymatische Amplifizierungsreaktionen geeignete Reaktionsräume, so daß diese als

Standards einsetzbar, definiert beschichteten Gefäße in einer über lange Zeiträume haltbar
Form überführt werden, ohne daß es zu Beeinträchtigungen der Qualität kommt.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind ein Satz von mindestens 2 Oligonukleotiden, ein
Testkit entsprechend Erfordernissen eines Routinelabors und mehrere
5 Verwendungsmöglichkeiten des Verfahrens.

Die nachfolgend beschriebene Erfindung stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, das
eine Grundlage zur vorzugsweise automatisierten quantitativen Messung kleinster Mengen von
Analytnukleinsäuren in diversen biologischen Materialien in Verbindung mit vorhergehender
enzymatischer Amplifikation darstellt. Das erfindungsgemäße Verfahren besteht darin,
10 Nukleinsäuren in eine zur Standardisierung quantitativer enzymatischer
Amplifizierungsreaktionen geeignete Form zu überführen. Überraschenderweise hat sich
herausgestellt, daß die erfindungsgemäße Methode die Herstellung von Nukleinsäure-
beschichteten, sog. „ready-to-use“ Standard-Reaktionsräumen erlaubt, die sich als einfach in
der Anwendung erwiesen haben, die problemlos über einen langen Zeitraum bei
15 gleichbleibender Qualität lagerbar und als Bestandteile von Testkits zu verwenden sind, somit
den Bedürfnissen von Routinediagnostiklabors insbesondere in Hinblick automatisierter
Analysen besser gerecht werden.

Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung sind einzelsträngige oder doppelsträngige DNA, RNA,
synthetische Analoga von DNA und RNA, sowie DNA, deren native Desoxy-Thymidin (dT)-
20 Basen durch Desoxy-Uracil (dU) vollständig oder partiell ersetzt sind. Die Herstellung
geeigneter Nukleinsäure-Standards erfolgt in einer dem Fachmann bekannten Form,
vorzugsweise mit Hilfe der PCR, unter Nutzung spezifischer Primer-Oligonukleotide (Beispiel
1, Punkt 1A-B). Als Nukleinsäure-Standards werden native, auf enzymatischem Wege
hergestellte Amplifizierungsprodukte oder synthetische Nukleinsäuren verwendet, deren
25 Nukleotidsequenz einer zu bestimmenden Sequenz homolog ist, vorzugsweise identisch oder
gekennzeichnet durch eine oder mehrere Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen ist, die
vorzugsweise außerhalb der Primer- und Sondenbindungsstellen liegen. DNA-Standards
werden mittels enzymatischer Amplifikation von Target-Sequenzen, vorzugsweise mittels
PCR, hergestellt, während RNA-Fragmente in bekannter Weise mittels *in vitro* RNA-Synthese
30 unter Nutzung von RNA-Polymerasen (siehe Beispiel 2, Punkt 2.1., C) gewonnen werden
können. Die hergestellten Nukleinsäurefragmente werden anschließend einer
Reinigungsprozedur unterzogen, wobei DNA vorzugsweise mittels Agarosegelektrophorese
und anschließender Extraktion der Standard-Nukleinsäure aus dem Trenngel gereinigt wird

(Beispiel 1, Punkt 1B) während *in vitro* hergestellte RNA in dem Fachmann bekannten Weise aus dem *in vitro* Synthese-Ansatz extrahiert wird (siehe Beispiel 2, Punkt 2.1., C). Die exakte Messung der Konzentration des gereinigten Nukleinsäure-Produktes erfolgt vorzugsweise mittels HPLC (Köhler et al. 1997, BioTechniques 23:722-726, Beispiel 1, Punkt 2). Anschließend wird von der kalibrierten Standard-Nukleinsäure eine Verdünnungsreihe hergestellt. Zur Verdünnung von DNA-Standards wird eine DNA-Lösung verwendet, die hergestellt wird, indem vorzugsweise DNA des Lambda-Phagen (z.B. Stamm: lambda cl 857 Sam 7, 48502 bp, Lambda-DNA) mittels 5 x 1-minütiger Ultraschall-Behandlung in Fragmente von ca. 1-2 Kilobasen (kb) überführt wird (Beispiel 1, Punkt 3; die durchschnittliche Fragmentlänge wurde mittels Agarosegelektrophorese ermittelt). Dieser Schritt soll die verbesserte Adsorption während des Lyophilisationsprozesses bewirken und zu erhöhter Haltbarkeit der Standard-Nukleinsäure im Reaktionsraum beitragen. Es ist auch möglich, die Lambda-DNA unmodifiziert einzusetzen oder statt Lambda-DNA E. coli tRNA zu verwenden. Zur Verdünnung von RNA-Standards wird vorzugsweise eine Transport-RNA (tRNA)-Lösung verwendet (Köhler et al. 1995, Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction - Nonradioactive PCR methods. Heidelberg, Springer-Verlag, Beispiel 2, Punkt 2.2.).

Zur Quantifizierung eines Meßparameters werden verschiedene Standardverdünnungen hergestellt (Beispiel 1, Punkt 3, Beispiel 2, Punkt 2.2.), die vorzugsweise die Messung des gesamten physiologischen oder technologischen Konzentrationsbereiches des zu messenden Analyten erlauben. Hiervon werden Aliquote zur Beschichtung derjenigen Reaktionsräume verwendet, in welchen die zur Erstellung beispielsweise einer Eichkurve erforderlichen enzymatischen Nukleinsäureamplifikationen ablaufen sollen. Vorzugsweise werden 8 separate Reaktionsräume mit 8 verschiedenen Standardverdünnungen (sog. 8-er Strip) beschichtet. Erfnungsgemäß erfolgt die Beschichtung so, daß Aliquote der jeweiligen Standard-Nukleinsäure-Verdünnung supplementiert mit der Träger-Nukleinsäure direkt in den verwendeten Reaktionsräumen schonend getrocknet werden (Beispiel 1, Punkt 4, Beispiel 2, Punkt 2.3.). In einer besonders bevorzugten Weise erfolgt diese Lyophilisation unter Nutzung einer Vakuum-Zentrifuge oder einer Gefriertrocknungsanlage. In einer weiteren Form der Ausgestaltung erfolgt die Trocknung mittels eines gleichwertigen Trocknungsverfahrens, beispielsweise einem Verfahren zur überhitzungsfreien Produkttrocknung unter Einsatz von Mikrowellen (z.B. vertrieben über GWE mbH, Leuna). Die -wie beschrieben- hergestellten, beschichteten Reaktionsräume sind dadurch gekennzeichnet, daß die adsorbierten Nukleinsäure-Standards so fest an der Innenseite des zur Beschichtung verwendeten

Reaktionsraumes haf... daß beispielsweise ein problemlos... Versand auf dem Postweg gewährleistet werden kann.

In den Figuren 1-4 ist beispielhaft dargestellt, welche Qualitätsanforderungen die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Nukleinsäure-Standards erfüllen. Zum praxis-relevanten Test der auf dem beschriebenen Verfahren basierenden Produkte ist das derzeit beste, äußerst reproduzierbare Ergebnisse liefernde ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) eingesetzt worden. Mit diesem Detektionsautomaten lassen sich unter Nutzung des erfindungsgemäßen Verfahrens prinzipiell hoch reproduzierbare Eichkurven mit Korrelationen >-0.99 erstellen (Figur 1). Die erfindungsgemäß mit DNA beschichteten Reaktionsräume (Beispiel 1), z.B. die sog. „Optical“ PCR Tubes, sind dem derzeitigen Stand der Technik überlegen, da diese im Vergleich zu herkömmlich eingesetzten PCR-Standards deutlich stabiler sind (Figur 2) und selbst bei Raumtemperatur über mindestens 1 Jahr ohne Qualitätsverlust lagerbar sind (Figur 3). Erfindungsgemäß mit in-vitro synthetisierter RNA beschichtete Reaktionsräume sind für mindestens 6 Monate sowohl bei – 20°C als auch Raumtemperatur stabil (Figur 4, Beispiel 2).

Die beschichteten Reaktionsgefäße werden aufrecht stehend in einer geeigneten, mindestens 96 Gefäß aufnehmenden Träger-Box erfindungsgemäß mit einer selbsthaftenden Folie (z.B. Plastik- oder Aluminium-Folie, Parafilm) verschlossen, um eine Kontamination mit Fremd-Nukleinsäuren während Lagerung und Transport zu vermeiden. Je ein mit Folie verschlossener 8-er Strip, somit 8 verschiedene Konzentrationen der zur Beschichtung eingesetzten Nukleinsäuren enthaltend, wird als „ZeptoStrip“ bezeichnet.

In den Reaktionsräumen können neben den kalibrierten Nukleinsäuren mindestens 2 spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten sein. Alternativ können verwendete Reaktionsräume auch alleinig die als spezifische als Primer bzw. Sonden fungierenden Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten. Die erfindungsgemäßen Testkits bestehen aus mindestens einem „ZeptoStrip“, mindestens 2 Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure.

Das Wesen der Erfindung liegt in einer Kombination bekannter Elemente und neuer Lösungswege, die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß nunmehr ready-to-use

Standard-Reaktionsräume für den quantitativen Nachweis ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen zur Verfügung stehen.

Neben dem Abstellen der oben genannten Nachteile des Standes der Technik weist das erfindungsgemäße Verfahren somit eine Reihe von Vorteilen auf:

- 5 1. Ein manueller oder automatisierter Transfer von verdünnten, zur Standardisierung eingesetzten Nukleinsäuren in die verwendeten Reaktionskompartimente entfällt, da diese bereits im Reaktionsgefäß in lyophilisierter Form vorliegen. Damit erhöht sich wesentlich die Nutzerfreundlichkeit, da die sofort einsetzbaren Standard-Strips nur entnommen und in eine 96-well Trägerplatte eingesetzt werden müssen. Nach Zugabe der vorzugsweise vorgemischten Reagenzien für die nachfolgende Amplifizierungsreaktion sind keine weiteren Manipulationen mehr notwendig. Diese Vereinfachung erlaubt somit eine konsequente Automatisierung quantitativer enzymatischer Reaktionen.
- 10 2. Da nunmehr keine Pipettierung konzentrierter Standards mehr erfolgt, ist eine potentielle Kontaminationsquelle ausgeschaltet und somit die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse deutlich verringert.
- 15 3. Durch Überführen der Standard-Nukleinsäuren in ein nicht-wässriges Milieu wird a) potentiell ein unerwünschter mikrobieller Abbau der als Standards verwendeten Nukleinsäuren eingeschränkt bzw. verhindert, und b) eine Lagerfähigkeit selbst extrem niedrig konzentrierter Nukleinsäuren über längere Zeiträume selbst bei Zimmertemperatur erreicht (Figur 2-4). Diese Vorzüge vereinfachen ganz wesentlich sowohl Versand als auch Anwendung der auf diesem Verfahren beruhender Testkits.
- 20 4. Die verwendeten Träger-Nukleinsäuren verhindern eine unspezifische Standard-Adsorption an die zur Herstellung der Verdünnungsreihen eingesetzten Einweg-Materialien und sind -nachweisbar bei Zusatz zu einem PCR-Ansatz- gleichzeitig ein potenter „Enhancer“ der enzymatischen Amplifikation.
- 25

Figur 1 zeigt eine typische Eichkurve, die mittels „real-time“ PCR-Produktmessung am ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System unter Nutzung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellter mdm-2 (murine double minute-2) Nukleinsäurestandards (Verwendung eines Standard-Strips, d.h. 8 verschiedener, lyophilisierter mdm-2 Standard-Nukleinsäurekonzentrationen) erhalten wurde (Beispiel 1, Punkt 5). Die errechnete Korrelationskoeffizient beträgt in diesem Fall -0.996.

Figur 2 zeigt [redacted] graphischer Form den Vergleich des erfindungsgemäßen Beschichtungsverfahrens und Nutzung der „real-time“ Detektion wie in Figur 1 mit dem derzeitigen Stand der Technik. Herkömmliche, d.h. in wäßrigem Milieu gelagerte und am Versuchstag aliquotierte mdm-2 Standard-DNA Fragmente verschiedener Konzentration (50, 5 250, 2500, 10000 und 50000 Moleküle pro PCR-Ansatz), supplementiert mit Träger-DNA, wurden mit lyophilisierten Standards gleicher Konzentration verglichen. Während konventionell gelagerte Standards insbesondere sehr niedriger Konzentration (50 bzw. 250 Moleküle pro Ansatz) bereits nach 14 Tagen Lagerung und 4-maligen Einfrier-/Auftau-Zyklen 10 vollständig abgebaut sind (äußert sich in der Abbildung durch Erreichen des Threshold Cycles 40, welcher der Amplifizierbarkeit 0 entspricht), ist bei Verwendung lyophilisierter Standards (ZeptoStrip) selbst bei niedrigsten verwendeten Nukleinsäurekonzentrationen kein Verlust 15 feststellbar.

Figur 3 zeigt PCR-Resultate, die mit ZeptoStrips "mdm2-DNA" erhalten wurden, welche über einen Zeitraum von 1 Jahr alternativ entweder bei -20°C oder bei Zimmertemperatur gelagert 20 wurden. Es ist zu erkennen, daß unabhängig von der Lagertemperatur identische PCR-Ergebnisse, d.h. weitgehend übereinstimmende Ct-Werte (d.h. parallele Kurven) erzielt wurden. Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß die immobilisierte mdm2-DNA unabhängig 25 von der Ansatzkonzentration und der Lagertemperatur über den gesamten untersuchten Zeitraum stabil bleibt.

Figur 4 zeigt TaqMan-PCR-Resultate, die mit ZeptoStrips „bcl2-cRNA“ erhalten wurden, welche über einen Zeitraum von 6 Monaten alternativ entweder bei -20°C oder bei Zimmertemperatur gelagert wurden. Analog den Ergebnissen für mdm2-DNA war auch 30 immobilisierte bcl2-cRNA unabhängig von der Ansatzkonzentration und der Lagertemperatur über den gesamten untersuchten Zeitraum stabil.

Die erfindungsgemäße Verwendung der mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsgefäße liegt in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen. Die Testkits bestehen aus mindestens einem mit Folie verschlossenen 8-er Strip, mindestens 2 Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure.

Die folgenden Beispiele dienen der Verdeutlichung der Erfindung, ohne sie auf diese Beispiele 35 zu beschränken.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1.

5

Beschichtung von Polypropylen-Reaktionsräumen ("Optical Tubes") mit definierten Konzentrationen von doppelsträngiger mdm-2 Standard-DNA

1.1. Herstellung eines mdm-2 spezifischen Standard-DNA Fragmentes mittels PCR

- 10 A. cDNA-Herstellung aus Gesamt-RNA, isoliert aus ADR5000 T-Lymphom-Zelllinie (resistenzselektiert mit 5 µg Adriamycin pro ml Kulturmedium)

- 15 • 1 µg mittels RNAZol™ "B" (Tel-Test, Friendswood, TX, USA) gereinigte RNA in einem 20-µl Standard Reaktionsansatz, bestehend aus AMV Reverse Transcriptase Puffer (250 mmol/l Tris/HCl, pH 8.3; 250 mmol/l KCl, 50 mmol/l MgCl₂, 50 mmol/l Dithiothreitol, 2.5 mmol/l Spermidin), 5 U AMV Reverse Transcriptase, 0.5 mmol/l eines jeden dNTPs (Promega, Madison, WI, USA), 10 U rekombinanter RNase Inhibitor (AGS, Heidelberg, FRG), 200 ng Oligo (dT) (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 1 Std. bei 42 °C in cDNA transkribieren

20

B. PCR-Amplifizierung und Reinigung des Produktes

➤ PCR

- 25 • Je 2 µl-Aliquote der hergestellten cDNA werden in 6 identischen 50-µl Standard PCR Ansätzen bestehend aus 100 ng jedes 3' bzw. 5' Primers, 5 µl 10x Taq Polymerase Puffer (100 mmol/l Tris/HCl, pH 8.3; 500 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl₂, 0.01% [wt/vol] Gelatine), 1.5 U AmpliTaq® Polymerase (Norwalk, CT, USA, Perkin-Elmer), und 8 µl dNTPs (0.2 mmol/l jedes Nukleotids unter Verwendung von dUTP anstatt dTTP) im GeneAmp®9600 Thermalcycler (Perkin-Elmer) amplifiziert.
- Programm: 94°C für 30 s, 55°C für 30 s, 72°C für 1 min

30

35 Zyklen

- Sequenzen der verwendete Amplifizierungsprimer (GenBank Accession Code für mdm-2: I25341)

MDM2PR1 (1245-1264) 5'-GCC.AAG.AAG.ATG.TGA.AAG.AG-3'

MDM2PR2 (100-1455) 5'-ACT.GGG.CAG.GGCTT.A.TT-3'

- Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes: 211 bp
 -
 - *Reinigung des 211 bp Fragmentes mittels Agarosegel-Elektrophorese*
- 5 • 1.5 % Agarose-Gel (Easy-Cast™ Minigel, AGS, Heidelberg) herstellen, Gelslots mit 6-er Kamm, Kammer mit TAE-Puffer füllen (Submarine-Gel)
- die hergestellten PCR-Ansätze poolen und quantitativ auftragen
- Elektrophorese bei 100V, 45 min ausführen
- Ethidiumbromid-gefärbte Banden im UV-Licht sichtbar machen, möglichst genau und schnell mit Skalpell ausschneiden, in 1.5 ml-Eppendorfgefäß überführen
- 10 • DNA aus Gelblocks mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hiltzen) laut Vorschrift reinigen (Elution mit H₂O)

1.2. Kalibrierung der Standard-Stammlösung mittels HPLC

- 15 ➤ *HPLC-Equipment:*
3-Line Degasser DG-980-50, PU-980 Intelligent HPLC Pump, Low Pressure Gradient Former, UV-975 UV/VIS Detector, AS-950 Intelligent Sampler, Column-Thermostat Jetstream 2 (Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, FRG).
- *Stationäre Phase:*
20 TSK DEAE-NPR Säule (4.6 mm ID, Länge: 35 mm) und DEAE-NPR Vorsäule (4.6 mm ID, Länge: 5 mm) (TosoHaas GmbH, Stuttgart, FRG)
- *Mobile Phase:*
Puffer A: 25 mmol/l Tris/HCl, 1 mol/l NaCl; pH 9.0
Puffer B: 25 mmol/l Tris/HCl; pH 9.0
- 25 ➤ *HPLC-Laufbedingungen:*
 - Druck: 80-120 bar (maximal 200 bar)
 - Flußrate: 1 ml/min
 - Temperatur: 20°C
 - UV-Detektion bei 260 nm
 - Analyt: ca. 10-200 ng gereinigtes PCR-Fragment, mit Puffer B auf 40 µl supplementieren, Injektion von 20 µl pro Lauf jeweils in Doppelbestimmung
 - 30 • Standard (separater Lauf): 36 µl Puffer B plus 4 µl Low Mass DNA Ladder™ (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), bestehend aus 6 glatt-endigen DNA-

Fragmenten im Bereich 100 bis 2000 bp (Endkonzentration: 5 bis 100 ng DNA pro Bande), Injektion von 20 µl pro Lauf (Doppelbestimmung)

- Diskontinuierliches Gradientenprogramm über 25 min wie folgt durchführen:

1. Equilibrierung der Säule mit 25% Puffer A in Puffer B
 2. 25% A in B: Probenauftrag bis 0.5 min
 3. 25-43% A in B: Linearer Gradient von 0.5-4.5 min
 4. 43-60% A in B: Linearer Gradient von 4.5-20 min
 5. 60-100% A in B: Linearer Gradient von 20-22 min
 6. 100-25% A in B: Linearer Gradient von 22-24 min
 7. 25% A in B: Equilibrierung von 24-25 min

Die Datengewinnung erfolgt mittels Integration der Peaks durch Borwin™ Chromatography Software, Version 1.20 (IMBS Developpements, Frankreich). Zur exakten Messung der Konzentration des gereinigten DNA-Standards wird die Fläche unter den individuellen Peaks ermittelt. Die unbekannte Konzentration der Standard-Nukleinsäure wird anhand der mittels Low Mass DNA Ladder™ erhaltenen Eichkurve berechnet.

1.3. Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe mit Träger-DNA

Träger-Nukleinsäure:

20 10 OD Lambda (dam+) DNA (aus Bakteriophage lambda cl857 Sam7, AGS GmbH, Heidelberg), gelöst in 0.5 ml 10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, wird in 5x 1 min-Intervallen und zwischenzeitlicher Kühlung auf Eis mittels Ultraschall-Bad (Transsonic T570, Ultrasonics) bei maximaler Leistung in ca. 1-2 kb-Fragmente überführt, davon wird eine 10 ng/ml-Verdünnung hergestellt (1:100), im weiteren als Lambda-DNA bezeichnet.

25

Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe für mdm-2 (20x conc.)

Standard- No.	Verdünnung SL (Herstellung)	Endkonzentration [zmol/Ansatz]	Moleküle pro Ansatz
1	1: 10^4	419.75	252.773
2	1: 10^4 → 1:5 (20µl [No.1]+80µl λ)	83.95	50.555
3	1: 10^4 → 1:10 (10µl [No.1]+90µl λ)	41.986	25.277
4	1: 10^4 → 1:25 (10µl [No.3]+90µl λ)	16.794	10.111

5	$1: 10^5 \rightarrow 1: 1 [No.3] + 180\mu l \lambda$	4.1	2.528
6	$1: 10^6 \rightarrow 1: 4 (25\mu l [No.5] + 75\mu l \lambda)$	1.050	632
7	$1: 10^6 \rightarrow 1: 10 (10\mu l [No.5] + 90\mu l \lambda)$	0.420	253
8	$1: 10^6 \rightarrow 1: 50 (2\mu l [No.5] + 98\mu l \lambda)$	0.084	51

λ = Lambda-DNA, 10

ng/ μ l

Zur Herstellung der Standard-Gebrauchslösungen werden je 5 µl der Standard-
5 Verdünnungsreihe in separate 1.7 ml Multi Twist Top Vials (Sorenson Bio Science, Salt Lake
City, UT, USA; Vertrieb: Carl Roth GmbH.: Kat.-Nr.: 8184.1) pipettiert. Zur Herstellung
multifunktioneller Strips (d.h. Strips, die zur sequentiellen oder simultanen quantitativen
Messung mehrerer verschiedener Nukleinsäure-Sequenzen geeignet sind) werden weitere 19
Standards (jeweils 5 µl pro Standard-Nukleinsäure) zugesetzt und -wenn erforderlich- bis zu
10 einem Endvolumen von 100 µl mit Lambda-DNA ergänzt.

1.4. Beschichtung der Reaktionsräume

- je 5 µl der unter Punkt 3 hergestellten Standard-Gebrauchslösungen in 8 verschiedene "optical tubes" (Fa. Perkin-Elmer, Kat.-Nr.: N8010935) pipettieren (von Position A1-A8 in abnehmender Konzentration), vorzugsweise diese Aliquotierung zur Verbesserung der Qualität mit einem Pipettier-Roboter (z.B. Biomek 2000, Fa. Beckman) ausführen
 - Amplifikationsgefäße in schwarze Eppendorf Zentrifugen-Adapter (0.2 ml) einsetzen und Proben 30 min lang in Vakuumzentrifuge (z.B. Univapo 100 H mit Unijet Refrigerated Aspirator, Fa. UniEquip) bis zur völligen Trockene bei eingeschalteter Rotor-
Gegenheizung lyophilisieren.

1.5. Test der hergestellten Strips mittels ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System

25 optimierte mdm-2 TaqMan™-Methode:

Programm: 2-Step-PCR 95°C 10:00 min, anschließend
 40 Zyklen 95°C 00:15 min
 60°C 01:00 min

Reaktionsbedingungen:

6 mM MgCl₂
 10 pM Primer mdm2Pr11 und mdm2Pr21
 2 pmol mdm2Probe
 50 ng Lambda-DNA (5 µl)
 2.5 U AmpliTaqGold™

dNTPs, Puffer aus TaqMan™ PCR Core Reagents Kit mit AmpliTaq™Gold

Ansatzvolumen: 50 µl

verwendete Primer- und Sondensequenzen (GenBank Accession Code für mdm-2: I25341)

mdm2Pr11 (1295-1318) 5'-GAG.AGT.GTG.GAA.TCT.AGT.TTG.CCC-3'

10 mdm2Pr21 (1352-1373) 5'-TGC.AAC.CAT.TTT.TAG.GTC.GAC.C-3'

mdm2Probe (1320-1350) 5'-FAM-TTA.ATG.CCA.TTG.AAC.CTT.GTG.
TGA.TTT.GTC.A-XT-3'-TAMRA

15 **Beispiel 2.**

Beschichtung von Polypropylen-Reaktionsräumen („Optical Tubes“) mit definierten Konzentrationen von bcl2 Standard-copy RNA (cRNA)

2.1. **Herstellung von bcl2 Standard cRNA, die sequenz-homolog zu nativer bcl2-mRNA ist**

(nach einer modifizierten Methode von:: Grassi G, Zentilin L, Tafuro S, Diviacco S, Ventura A, Falaschi A, Giacca M. A rapid procedure for the quantitation of low abundance RNAs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res 1994; 22: 4547-4549)

25

A. Herstellung von bcl2 Template DNA mit inkorporiertem T7-Promoter

➤ Herstellung eines bcl2 Target-Fragmentes mit PCR1

- 100 ng CCRF ADR5000 cDNA (siehe Beispiel 1.1, A) wurden wie unter Beispiel 1.1, B in einem TRIO-Thermoblock™ 48 Thermal Cycler (Biometra, Göttingen) amplifiziert.

30 Temperaturprofil PCR1: 94°C für 30 s, 55°C für 30 s, 72°C für 1 min
40 Zyklen

- Sequenzen der verwendeten Amplifizierungsprimer (GenBank Accession Code für bcl2: M14747)

BCL2PR1 (3495-3516): 5'-CTT.TTG.CTG.TGG[REDACTED]T.TTT.G-3'

BCL2PR2 (3896-3915): 5'-CTT.CTC.CTT.TTG.GGG.CTT.TT-3'

- Theoretische Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes: 418 bp

- 5 ➤ *Inkorporation der T7-Promotersequenz in das synthetisierte bcl2-Target-Fragment mittels PCR2*

Tabelle 2/1: Pipettierschema für PCR2 (Herstellung von 6 identischen Ansätzen)

Reaktionskomponenten	Ansatzvolumen µl
H ₂ O (HPLC-rein)	21,5
10x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl ₂ (PE Applied Biosystems)	5
dNTPs (je 1,25 mM, Promega/Boehringer Mannheim)	8
Primer bcl2-1T7 (50 ng/µl), verdünnt mit H ₂ O	6
Primer bcl2Pr2 (50 ng/µl), verdünnt mit H ₂ O	2
bcl2-Target Produkt (siehe 2.1. A, 1:1000 verdünnt mit H ₂ O)	5
AmpliTaq Gold (0,5 U/µl, PE Applied Biosystems)	2,5

- Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem Temperaturprofil:
 einmalig 95°C für 10 min, 40 Zyklen 95°C für 30 sec, 55°C für 30 sec, 72°C für 1 min,
 einmalig 72°C, 5 min, 4°C ∞
- Sequenzen der verwendeten Amplifizierungsprimer:
 BCL2PR2 (3896-3915): (siehe oben)
 bcl2-1T7: (unterstrichene Sequenz: T7-Promoter)
 $5'$ -cg~~g~~.gat.c~~g~~.gat.c~~c~~t.a~~a~~t.a~~c~~g.a~~c~~t.c~~a~~c.t~~a~~t.a~~g~~g.g~~a~~CT.TTT.GCT.GTG.GGG.TTT.TG-3'
- Theoretische Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes: 455 bp

B. Reinigung und Kalibrierung des bcl2T7-DNA-Fragmentes

wie unter Beispiel 1.1. und 1.2. beschrieben

C. In-vitro cRNA-Synthese (Herstellung von 3 identischen Ansätzen)

Tabelle 2/2: Pipettierschema zur Herstellung der bcl2-cRNA-Syntheseansätze

Reaktionskomponenten	Ansatzvolumen µl
RNase-freies H ₂ O (mit DEPC behandelt)	1
10x Transcription Buffer (Boehringer Mannheim)	2
ATP (20 mM, Amersham Pharmacia)	1
UTP (20 mM, Amersham Pharmacia)	1

GTP (20 mM, Amersham Pharmacia)	1
CTP (20 mM, Amersham Pharmacia)	1
gereinigtes bcl2-T7 dsDNA Fragment (6 ng/ μ l)	10
T7-RNA Polymerase (Boehringer Mannheim, 20U/ μ l)	2
RNase-Inhibitor (Amersham Pharmacia, 10 U/ μ l)	1

- Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 1 Std. bei 37°C im Thermoschüttler.
- Zur Erhöhung der cRNA-Ausbeute wurden nach Ablauf der Inkubation weitere 20 U T7 Polymerase pro Ansatz zugesetzt, danach wiederum Inkubation für 1 Std. bei 37°C (Thermoschüttler).
- Anschließend wurden alle drei Ansätze vereinigt und mit 60 U DNase I (RNase-frei, Boehringer Mannheim) für 50 min bei 37°C verdaut.
- Die Reinigung der cRNA erfolgte mittels konventioneller Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol- (25:24:1) Extraktion wie in: Köhler T, Laßner D, Rost A-K, Thamm B, Pustowoit B, Remke H Eds.): Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction - Nonradioactive PCR methods., Springer-Verlag Heidelberg, S. 36-37 beschrieben.
- Die Fällung der cRNA wurde für ca. 3 Std. bei -20°C durchgeführt, danach wurde 3x mit 300 μ l 75% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und das Pellett unter 100 μ l 96%igem Ethanol über Nacht bei -20°C gelagert.
- Am nächsten Tag erfolgte die Trocknung des Pelletts in einer Vakuum-Zentrifuge (Univapo 100 H, UniEquip), das getrocknete Pellett wurde in 25 μ l DEPC-H₂O gelöst, die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach UV 260/280-Messung von 2x 2 μ l-Aliquoten in 500 μ l-Quartzküvetten.
- Die Gesamtausbeute aller 3 Ansätze betrug ca. 23 μ g cRNA bei einem Ratio 260/280 >1,8.

20

D. Charakterisierung der synthetisierten cRNA mittels nicht-denaturierender Agarosegel-Elektrophorese

(nach einer modifizierten Methode von: Collins ML, Zayati C, Detmer JJ, Daly B, Kolberg JA, Cha TA, Irvine BD, Tucker J, Urdea MS. Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays. Anal Biochem 1995; 226:120-129)

- Eine Minigel-Kammer (Easy-Cast™, AGS Heidelberg) wurde über Nacht mit 2%-iger Absolve NEF-971G Reinigungslösung (DuPont) RNase-frei gemacht, anschließend wurde 2x mit DEPC-H₂O gespült.
- Herstellung des Gels: 1%-iges Agarosegel (Qualex-Gold-Agarose, AGS) mit 1x TAE-Puffer (aus 50x Stammlösung mit DEPC-H₂O) herstellen (Ethidiumbromid [1,6 µl 10% EtBr] eingegossen), 10er Kamm; Laufpuffer: 1x TAE (4 µl EtBr/100 ml)
- Zur gereinigten und resuspendierten cRNA (ca. 1 µg pro 4 µl Volumen) sowie 4 µl einer 0,16-1,77 Kb RNA-Ladder (Gibco BRL) wurden 4 µl Formamid zugeben, und anschließend 5 min bei 65°C inkubiert.
- Danach erfolgte eine rasche Abkühlung auf Eis sowie anschließende Zugabe von 1 µl Gelladepuffer (RNase-frei) pro Tube, vom fertigen Ansatz werden 4 µl-Aliqote in die Testgel-Taschen pipettiert (Marker in die Außenslots, cRNA-Probe in die Innenslots).
- Die elektrophoretische Trennung wurde für ca. 2 Std. bei 80 V in der im Eisbad gekühlten, RNase-freien Minigel-Kammer durchgeführt. Eine Pufferzirkulation wurde durch intermittierende Bewegung des Laufpuffers in der Kammer erreicht.
- Die RNase-freie Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mittels GelPrint Video Documentation Workstation (MWG-Biotech, Ebersberg) unter Nutzung von ONE-Dscan™ Software (Scianalytics, Billerica, MA, USA).
- Dem theoretischen Molekulargewicht der synthetisierten bcl2-cRNA von 418 b stand ein experimentell bestimmtes Molekulargewicht von ca. 400 b gegenüber.

2.2. Herstellung einer bcl2-cRNA-Verdünnungsreihe

Die Verdünnung der gereinigten bcl2-cRNA erfolgte mit E.coli tRNA-Lösung (100 ng/µl DEPC-H₂O, Boehringer Mannheim).

Tabelle 2/3: Herstellung einer bcl2-cRNA-Verdünnungsreihe nach folgendem Schema:

Standard Nr.	cRNA-Verdünnungsfaktor	RNA-Konzentration (Angabe in zmol pro 5 µl verdünnter Lösung)
1	1:10 ³	1610
2	1:10 ⁴	161,05
3	1:10 ⁵	16,105

4	$1:10^5 \rightarrow 1:5$	3,22
5	$1:10^6$	1,6105
6	$1:10^6 \rightarrow 1:5$	0,322
7	$1:10^7$	0,16105
8	$1:10^8$	0,016105

2.3. Beschichtung von 96 „Optical Tubes,, (1 Platte) mit bcl2 Standard-cRNA definierter Konzentration

- Von jeder bcl2-cRNA-Verdünnung (siehe Tabelle 2/3) wurden 150 µl hergestellt und in ein bereitgestelltes, kühlbares Rack einer Biomek®2000 Pipettierworkstation (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) positioniert.
- Eine 96-well Trägerplatte wurde mit 96 „Optical Tubes,, beschickt und ebenfalls in die dafür vorgesehene Position der Workstation gesetzt.
- Mit Hilfe des Roboters und unter Nutzung geeigneter, gestopfter Einweg-Pipettenspitzen wurden je 5 µl von Standard „1,, in die „Optical Tubes,, der Position A1-A12, von Standard „2,, in Tubes B1-B12, von Standard „3,, in Tubes C1-C12 usw. pipettiert.
- Die Standard-cRNA enthaltenen Gefäße wurden anschließend komplett für 30 min bei – 80°C schockgefroren und unter Vermeidung eines zwischenzeitlichen Auftausens sofort in einer vorgekühlten Lyovac GT2 (AMSCO Finn-Aqua GmbH, Hürth) für 1 Std. lyophilisiert.
- Anschließend wurden die Tubes mit einer selbstklebenden Folie (z.B. Biomek™ Seal & Sample Aluminium-Folien, Beckman Instruments) manuell verschlossen. Die ZeptoStrips „RNA,, wurden generiert, indem die an den Tubes anhaftende Folie vertikal so geschnitten wurde, daß zusammenhängende Strips der Positionen A1-H1, A2-H2, A3-H3 usw. entstanden, welche jeweils eine Konzentration einer jeden bcl2-cRNA Verdünnung enthielten.
- Von den nunmehr hergestellten 12 Strips wurden je 6 Strips alternativ entweder bei –20°C oder bei Zimmertemperatur über den untersuchten Zeitraum gelagert

25

2.4. Analyse der hergestellten bcl2 cRNA Strips mittels ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System

A. Materialien:

- 5x TaqMan EZ Puffer: 250 mM Bicine, 575 mM K-acetate, 0.05 mM EDTA, 300 nM ROX (6-carboxy-tetramethyl-rhodamin), 40% (w/v) Glycerol; pH 8.2
 - 25 mM Mn(OAc)₂
 - dNTPs: dATP (10 mM), dCTP (10 mM), dGTP (10 mM) und dUTP (20 mM) im Volumenverhältnis 1:1:1:1 gemischt

B. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

bcl2Pr1 (3498-3516) wie oben
 10 bcl2Pr21 (3572-3591) 5'-GCA.AGT.GCA.GCC.ACA.ATA.CT-3'
 bcl2Sonde (3547-3568) 5'-FAM-CAG.TTC.TGG.GGC.CAA.GAG.GCT.GTCT-3'
 TAMRA

(FAM = 6-carboxyfluorescein, TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine)

15 C. Kombinierte Reverse Transcription und PCR (RT-PCR) unter Nutzung des Enzyms rTth
Polymerase (PE Applied Biosystems)

- Am jeweiligen Versuchstag wurden in je einen der alternativ bei -20°C oder Raumtemperatur gelagerten bcl2-cRNA Strips folgende Reaktionskomponenten pipettiert (Tabelle 2/4, S = Standard-Nr., Ansatzvolumen: 50 µl)

Tabelle 2/4: PCR3

Temperaturprofil am ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System:

59°C, 30 min (Reverse Transcription)

95°C, 5 min

40 Zyklen 95°C, 15 sec

5 59°C, 1 min

- Mittels PCR3 (Tabelle 2/4) wurde die Stabilität von erfindungsgemäßen bcl2-cRNA Strips nach jeweils 7, 14, 28, 90 und 180 Tagen Lagerung (sowohl -20°C als auch Raumtemperatur) analysiert. Die Ergebnisse sind in Figur 4 zusammengefaßt.

10

Legende zu den Figuren

Figur 1:

15 Charakteristische Eichkurve, erstellt mittels PCR-Produkt Messung am ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System unter Verwendung eines "ZeptoStrips", welcher mit dem erfindungsgemäßen Verfahren mit mdm-2 DNA beschichtet wurde, sowie der zugehörigen Methode (siehe Ausführungsbeispiel 1, Punkt 5), $r = -0.996$.

20 Figur 2:

Vorteile von ZeptoStrips (ZS) im Vergleich zu Standard-Nukleinsäuren, die nach derzeitigem Stand der Technik konventionell im wäßrigen Milieu gelagert wurden. Gestrichelte Linien: konventionelle Lagerung, durchgezogene Linien: ZeptoStrip. Legende: Initiale Zahl von Nukleinsäuremolekülen per PCR-Ansatz.

25

Figur 3:

Lagerfähigkeit von ZeptoStrips mdm2-DNA über einen verfolgten Zeitraum von 1 Jahr ohne Qualitätsverluste. Legende: Initiale Zahl von Nukleinsäuremolekülen pro PCR-Ansatz. Durchgezogene Linien: Lagerung bei +25°C, gestrichelte Linien: Lagerung bei -20°C.

30

Figur 4:

Stabilität von ZeptoStrips „bcl2-cRNA“, die über einen Zeitraum von 6 Monaten alternativ entweder bei -20°C oder bei Zimmertemperatur gelagert wurden. Dargestellt sind die für jede

Standard-Konzentrationen berechneten Regressionsgeraden unter Berücksichtigung aller jeweils bei -20°C und +25°C-Lagerung erhaltenen Meßwerte. Legende: Konzentration der im Reaktionsraum immobilisierten bcl2-cRNA in zeptomol pro Ansatz.

Patentansprüche

1. Mit nativen, synthetisch oder enzymatisch hergestellten Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsräume, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschichtung auf nicht-kovalentem Wege an chemisch oder biochemisch nicht-modifizierte Oberflächen der Innenwandung von Reaktionsräumen erfolgt.
2. Reaktionsräume nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Glas- oder Plastik-Gefäßen oder aus Glaskapillaren bestehen, die mit nativen, synthetischen oder partiell-synthetischen Nukleinsäuren (DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA, dU-haltige DNA) beschichtet sind.
3. Verfahren zur Herstellung der Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 und 2 unter Verwendung von Standard-Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß definierte Mengen gelöster nativer, synthetischer oder partiell-synthetischer Nukleinsäuren (DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA, dU-haltige DNA) direkt in zur enzymatischen Amplifikation geeignete Reaktionsräume aliquotiert werden und die Nukleinsäure anschließend nicht-kovalent direkt an die Innenwandung des Reaktionsraumes durch schonende Lyophilisierung der Probe adsorbiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Gefäße bzw. Glaskapillaren beschichtet werden.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß konzentrierte Stock-Lösungen der zu adsorbierenden Nukleinsäuren mittels eines geeigneten Analyseverfahrens exakt kalibriert werden, bevor diese zur Herstellung der zur Beschichtung verwendeten Nukleinsäure-Verdünnungsstufen eingesetzt werden.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß während des Lyophilisationsprozesses den zu adsorbierenden Standard-Nukleinsäuren eine definierte Menge einer spezifischen Träger-Nukleinsäure beigemischt wird, die zuvor mittels eines physikalischen Verfahrens (z.B. Ultraschallbehandlung) in Fragmente einer mittleren Länge von ca. 1-2 kb überführt wurde oder unmodifiziert verwendet wird und welche der zu detektierenden Nukleinsäuresequenz eine möglichst minimale Sequenzhomologie aufweist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA des Lambda-Phagen oder E. coli tRNA eingesetzt wird.

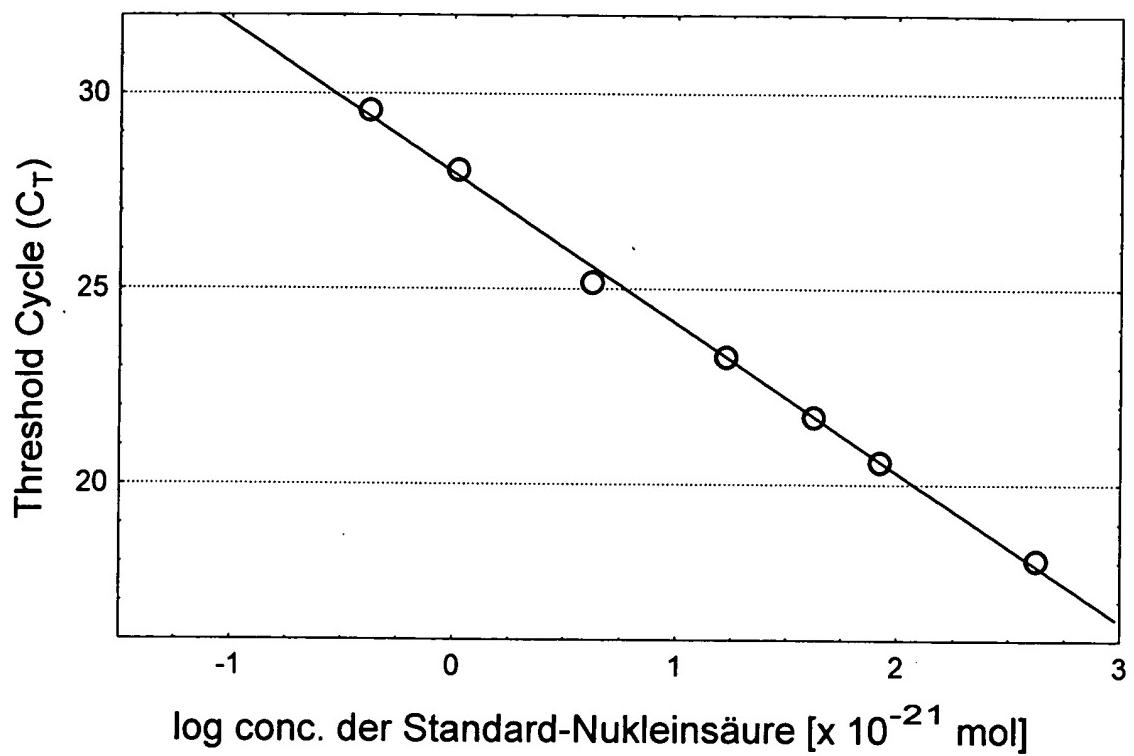
8. Verfahren nach Ansprüchen 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß entsprechende Reaktionsräume simultan mit einer Vielzahl (mindestens 2) diverser, Analytsequenzspezifischer kalibrierter Nukleinsäuren, ggf. unterschiedlichem zellulären oder organischen Ursprungs bzw. aus verschiedenen Spezies stammend, beschichtet werden.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschichtung von mindestens 96, im Mikrotiterplatten-Format angeordneten Reaktionsräumen mit mindestens 12x 8 sequenzspezifischen Standard-Nukleinsäuren abnehmender, den gesamten physiologischen oder technologischen Konzentrationsbereich der zu messenden Analytnukleinsäure erfassenden Konzentrationen (höchste Konzentration: A1-12, niedrigste Konzentration: H1-12), erfolgt.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die beschichteten Reaktionsräume aufrecht stehend in einer geeigneten, mindestens 96 Gefäße aufnehmenden Träger-Box verschlossen werden.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 10, wobei in den Reaktionsräumen neben den kalibrierten Nukleinsäuren mindestens 2 spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form enthalten sind oder spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in separaten Gefäßen ohne Nukleinsäure-Standard in lyophilisierter Form enthalten sind.
12. Verwendung der mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 bis 11 in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen.
13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Testkits aus mindestens einem mit Folie verschlossenen ZeptoStrip (8-er Strip aus verschlossenen, mit 8 verschiedenen Nukleinsäure-Konzentrationen beschichteten Reaktionsräumen), mindestens 2 Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure bestehen.

Zusammenfassung

Reaktionsräume mit definierten Konzentrationen von Nukleinsäuren, Verfahren zur Beschichtung der Reaktionsräume, die zur Standardisierung quantitativer enzymatischer Nachweisverfahren dienen, dadurch gekennzeichnet daß die Konzentration der verwendeten Nukleinsäuren exakt ermittelt wird, hiervon eine den erwarteten Meßbereich erfassende Verdünnungsreihe unter Verwendung einer physikalisch in kleinere Fragmente überführten Träger-Nukleinsäure hergestellt wird, wobei Aliquote dieser Nukleinsäure-Verdünnungen in für enzymatische Amplifizierungen geeigneten Reaktionsräumen einer schonenden Trocknung unterworfen werden, wobei 8 verschiedene Konzentrationen der jeweils lyophilisierten Standard-Nukleinsäure als „ZeptoStrip“ bezeichnet werden und Testkit, in dem das erfindungsgemäße Verfahren Anwendung findet.

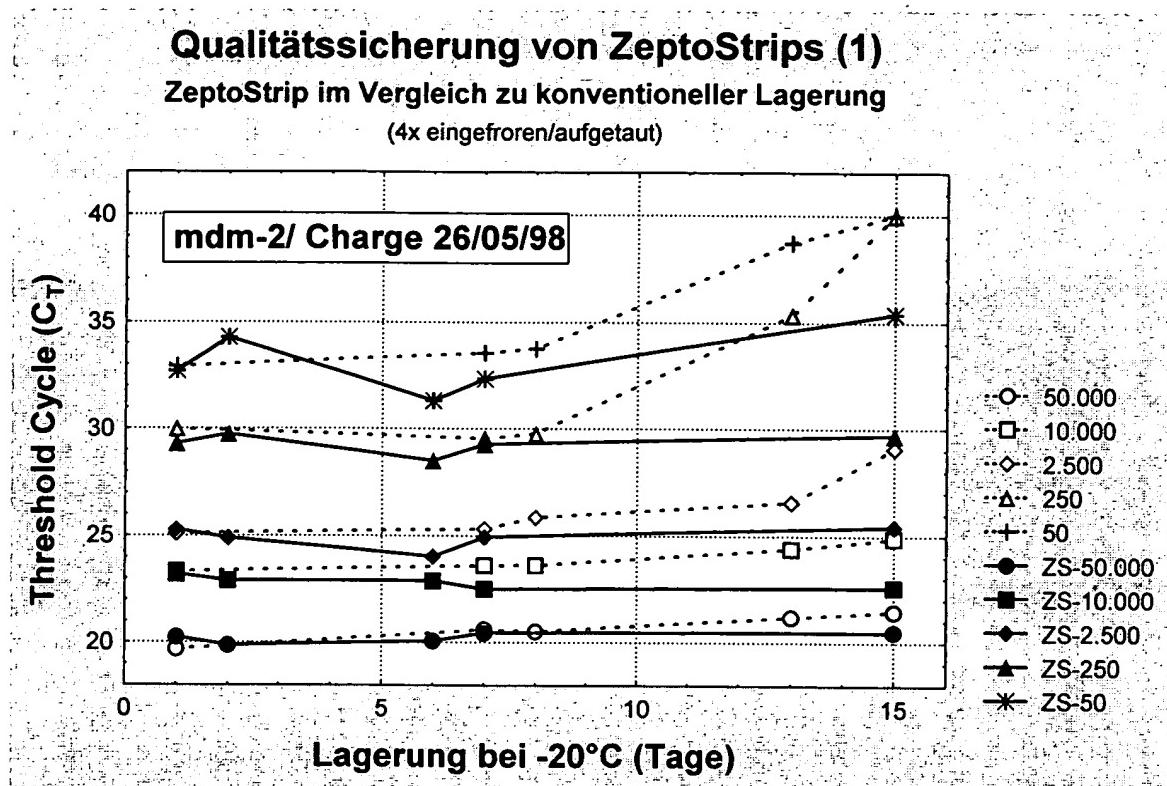
Figur 1

1/4



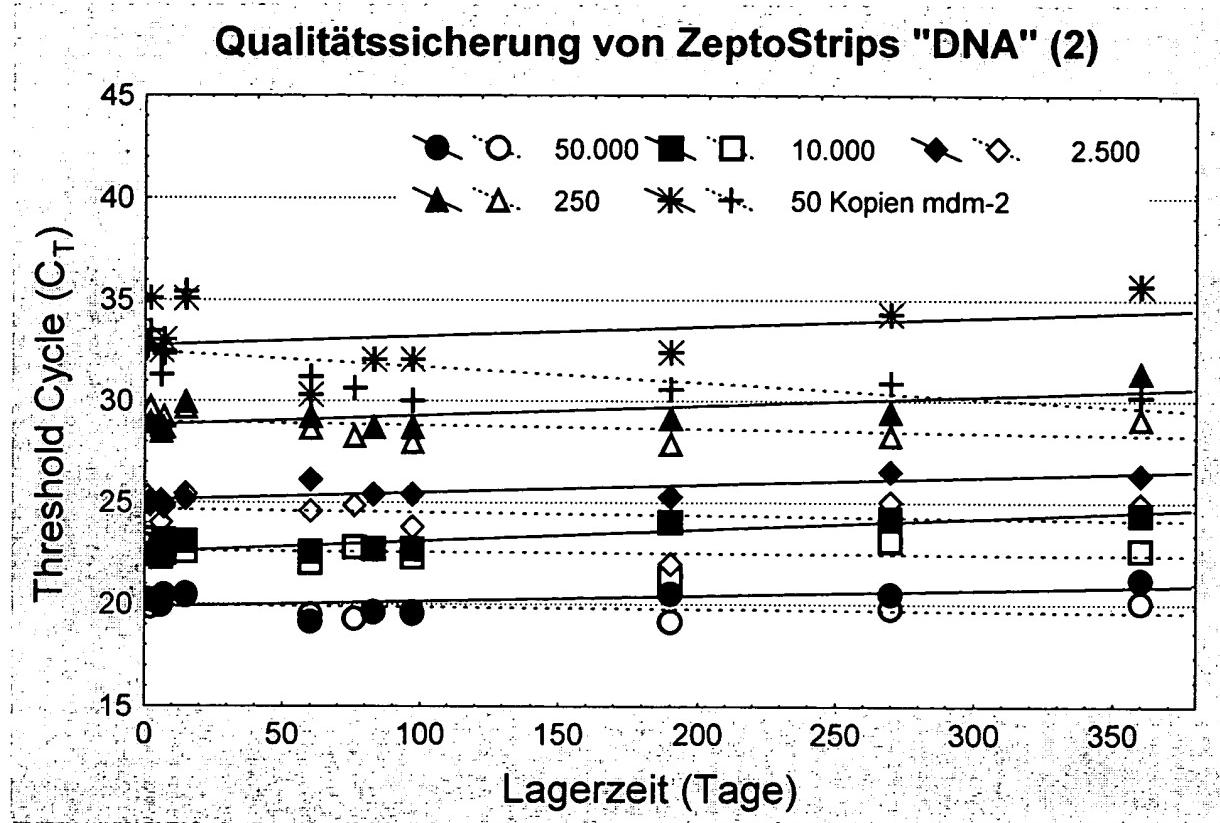
Figur 2

2/4



Figur 3

3/4

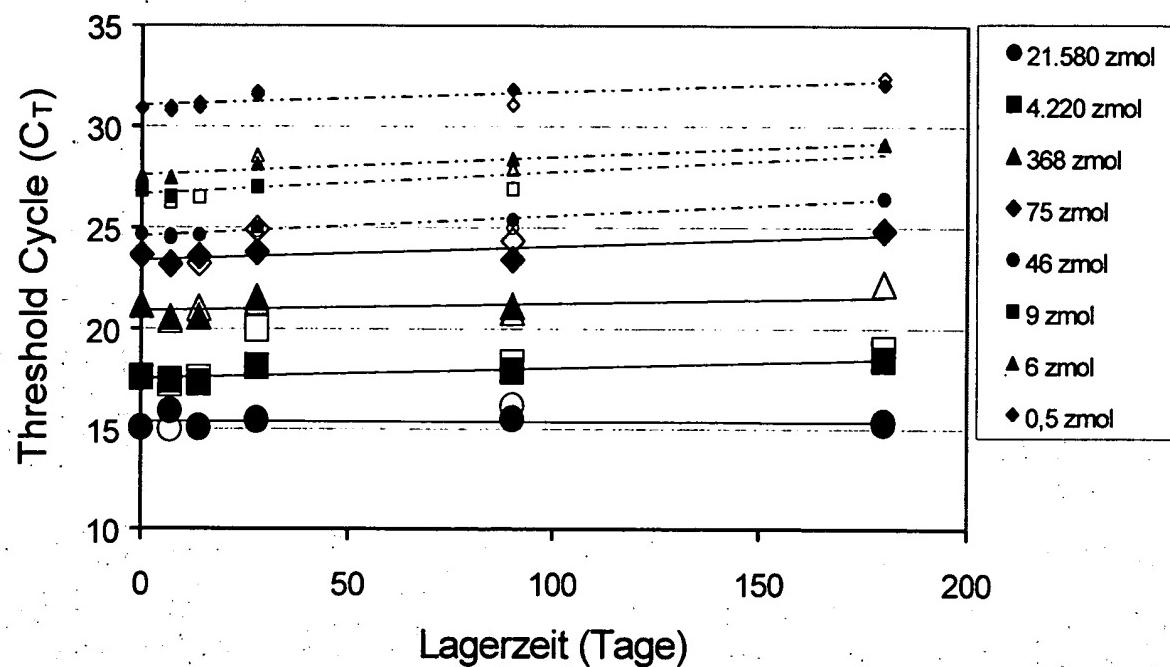


Figur 4

4/4

Qualitätssicherung von bcl-2 cRNA Standard Strips

ZeptoStrips bei -20°C (leere Symbole) und Raumtemperatur (volle Symbole) gelagert



57

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

REC'D 16 OCT 2000

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 9961	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02715	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/08/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 28/08/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		

Anmelder
KOEHLER, Thomas

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
 2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I Grundlage des Berichts
- II Priorität
- III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 27/03/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 12.10.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter BROCHADO GARGANTA, M <small>Tel. Nr. +49 89 2399 8935</small>



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02715

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-18 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 mit Telefax vom 19/05/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

3. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N) Ja: Ansprüche 4, 9
 Nein: Ansprüche 1-3, 5-8, 10-16

Erfinderische Tätigkeit (ET) Ja: Ansprüche
 Nein: Ansprüche 1-16

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) Ja: Ansprüche 1-16
 Nein: Ansprüche

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02715

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:
 - (A) Day I N M et al.: Biotechniques, Bd. 18, Nr. 6, 1995, Seiten 981-984-984
 - (B) EP-A-0 726 310
 - (C) FR-A-2 674 253
 - (D) Stratagene Catalogue, Seiten 274-277
 - (E) Sambrook J. et al.: 'molecular cloning' 1987
2. Die mit dem Fax vom 19.05.2000 eingereichten Änderungen bringen keine Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 34(2)(b) PCT über den Offenbarungsgehalt der Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen.
3. Neuheit
 - 3.1 Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist nicht neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT, da die beanspruchten mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsräume im Dokument A offenbart sind.

Dokument A offenbart die Anwendung von mit DNA beschichteten Gefäßen, wobei die Beschichtung mit zu untersuchenden DNA-Standard Proben erfolgt (siehe Seiten 982 and 983, "*Dried template DNA*" and "*Dried PCR oligonucleotides*"). Nach Trocknung haften die adsorbierten DNA-Standards an der Innenseite des zur Beschichtung verwendeten Reaktionsraumes (siehe Seite 983).

- 3.2 Aus dem gleichen Grund ist der Gegenstand der abhängigen Ansprüche 2, 3 und 5 auch nicht neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT (siehe Seiten 981, 983).
- 3.3 Das Verfahren zur Herstellung der mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsräume (Anspruch 6 der vorliegenden Anmeldung) und die Verwendung der beanspruchten Reaktionsräume zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäure in biologischen Substanzen (Anspruch 15 der vorliegenden Anmeldung) sind auch nicht neu (Artikel 33(2) PCT), da diese im Dokument A offenbart sind (siehe die Verwendung dieser Reaktionsräume für die Untersuchung von Patienten, Seiten 981 und 982).

Das gleiche gilt für die abhängigen Ansprüche 7, 8, 10-14 und 16. Diese sind auch nicht neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT (siehe Seiten 981 und 983).

4. Erfinderische Tätigkeit

- 4.1 Die abhängigen Ansprüche 4 und 9 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen des Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit erfüllen.
- 4.2 Der Fachmann würde es als übliche Vorgehensweise ansehen, Lambda-DNA oder tRNA-Lösung zur Verdünnung von DNA- und RNA-Standards zu verwenden. Der Gegenstand der Ansprüche 4 und 9 beruht somit nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit und erfüllt damit nicht das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium.

5. Folgende Bemerkungen sind jedoch zu berücksichtigen:

Nach Angabe der vorliegenden Erfindung bewirken Träger-Nukleinsäure eine verbesserte Adsorption während der Lyophilisationsprozesses und führen zu erhöhter Haltbarkeit der Standard-Nukleinsäure im Reaktionsraum. Jedoch ist der Begriff "Träger-Nukleinsäure" nicht in den Ansprüchen weiter definiert. Unter diesem Begriff könnte eine Reihe von verschiedenen Nukleinsäure-Lösungen verstanden werden.

Durch die breite Formulierung der beanspruchten Reaktionsräume können alle Gefäße mit einer DNA-Lösung in den nicht genau definierten Schutzbereich des

Anspruchs 1 aufgenommen werden.

6. Die folgenden im Recherchenbericht angegebenen Dokumente sind nicht neuheitsschädlich für die vorliegenden Ansprüche aus folgenden Gründen heraus:

Dokumente B offenbart die Herstellung stabiler lyophilisierten Enzymkompositionen, die bei der PCR benutzt werden können. Dabei werden aber die Nukleinsäure erst nach der Lyophilisation beigefügt. Die Beschichtung der Gefäße erfolgt im Gegensatz zur erfindungsgemäßen Beschichtung nicht mit Nukleinsäuren. Das gleiche gilt für Dokument C. Dokument D und E beziehen sich auf die Synthese und Isolierung von Oligonukleotiden, und haben in Gemeinsam mit der vorliegenden Erfindung nur die Durchführung eines Lyophilisationsprozesses.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Die Anmeldung beansprucht zu Recht das Prioritäts-Datum vom 28.08.1998. Das im Recherchenbericht als Zwischenliteratur angegebene Dokument (DE 197 16 154 A) ist eine nationale Deutscher-Anmeldung, die am 22. Oktober 1998 veröffentlicht wurde. Ihr Inhalt gilt daher nicht als Stand der Technik und wird nicht bei der Prüfung auf Neuheit oder erforderliche Tätigkeit berücksichtigt.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

- 1.1 In Anspruch 1 wird die Erfindung durch das zu erreichende Ergebnis angegeben (die Beschichtung mit Nukleinsäuren). Somit ist der Gegenstand des Anspruchs 1 unklar (Artikel 6 PCT).
- 1.2 Die breite Formulierung in Anspruch 1 führt zur Unklarheit des Anspruchs hinsichtlich dem Schutzmfang (Artikel 6 PCT). Alle Gefäße mit einer DNA-Lösung können in

den nicht genau definierten Schutzbereich des Anspruchs 1 aufgenommen werden.

2. Die Verwendung von folgenden relativen Begriffen führt zur Unklarheit des jeweiligen Anspruchs:

Ansprüche 5 und 10: "...möglichst minimale..."

Anspruch 6: "...schonende Lyophilisierung..."

Anspruch 12: "...technologischen Konzentrationsbereich..."

Patentansprüche

1. Mit nativen, synthetisch oder enzymatisch hergestellten Nukleinsäuren beschichtete Reaktionsräume, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschichtung mit kalibrierten Standard-Nukleinsäuren unter Zusatz definierter Mengen Träger-Nukleinsäuren auf nicht-kovalentem Wege an chemisch oder biochemisch nicht-modifizierte Oberflächen der Innenwandung von Reaktionsräumen erfolgt.
2. Reaktionsräume nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Glas- oder Plastik-Gefäßen oder aus Glaskapillaren bestehen.
3. Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleinsäuren DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA, dU-haltige DNA eingesetzt werden.
4. Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) zur Verdünnung von DNA-Standards eine DNA-Lösung des Lambda-Phagen
 - b) zur Verdünnung von RNA-Standards eine tRNA-Lösung verwendet wird.
5. Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Träger-Nukleinsäure mittels eines physikalischen Verfahrens in Fragmente einer mittleren Länge von ca. 1-2 kb überführt wurde und welche der zu detektierenden Nukleinsäuresequenz eine möglichst minimale Sequenzhomologie aufweist.
6. Verfahren zur Herstellung der Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß kalibrierte Standard-Nukleinsäuren unter Zusatz definierter Mengen Träger-Nukleinsäuren direkt in zur enzymatischen Amplifikation geeignete Reaktionsräume aliquotiert werden und anschließend nicht-kovalent direkt an die Innenwandung des Reaktionsraumes durch schonende Lyophilisierung der Probe adsorbiert werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß Gefäße bzw. Glaskapillaren beschichtet werden.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleinsäuren DNA, RNA, synthetische Analoga von DNA und / oder RNA, dU-haltige DNA eingesetzt werden.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß
a) zur Verdünnung von DNA-Standards eine DNA-Lösung des Lambda-Phagen
b) zur Verdünnung von RNA-Standards eine tRNA-Lösung
verwendet wird.

10. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Träger-Nukleinsäure mittels eines physikalischen Verfahrens in Fragmente einer mittleren Länge von ca. 1-2 kb überführt wurde und welche der zu detektierenden Nukleinsäuresequenz eine möglichst minimale Sequenzhomologie aufweist.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß entsprechende Reaktionsräume simultan mit einer Vielzahl (mindestens 2) diverser, Analytsequenzspezifischer kalibrierter Nukleinsäuren, ggf. unterschiedlichem zellulären oder organischen Ursprungs bzw. aus verschiedenen Spezies stammend, beschichtet werden.

12. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschichtung von 96, im Mikrotiterplatten-Format angeordneten Reaktionsräumen mit 12x 8 sequenzspezifischen Standard-Nukleinsäuren abnehmender, den gesamten physiologischen oder technologischen Konzentrationsbereich der zu messenden Analytnukleinsäure erfassenden Konzentrationen (höchste Konzentration: A1-12, niedrigste Konzentration: H1-12), erfolgt.

13. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die beschichteten Reaktionsräume aufrecht stehend in einer geeigneten, 96 Gefäße aufnehmenden Träger-Box verschlossen werden.

14. Verfahren nach den Ansprüchen 6 bis 13, wobei in den Reaktionsräumen neben den kalibrierten Nukleinsäuren mindestens zwei spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in lyophilisierter Form

enthalten sind oder spezifische als Primer bzw. Sonden fungierende markierte oder unmarkierte Oligonukleotide, die Träger-Nukleinsäure sowie weitere für die enzymatische Amplifikation erforderliche Reaktionskomponenten in separaten Gefäßen ohne Nukleinsäure-Standard in lyophilisierter Form enthalten sind.

15. Verwendung der mit Nukleinsäuren beschichteten Reaktionsräume nach den Ansprüchen 1 bis 14 in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren in biologischen Substanzen.

16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Testkits aus mindestens einem mit Folie verschlossenen ZeptoStrip (8-er Strip aus verschlossenen, mit 8 verschiedenen Nukleinsäure-Konzentrationen beschichteten Reaktionsräumen), mindestens 2 Oligonukleotiden sowie einer Träger-Nukleinsäure bestehen.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 9961	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/ 02715	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 27/08/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/08/1998
Anmelder KOEHLER, Thomas		

Dieser Internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser Internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt Ihnen jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

- wie vom Anmelder vorgeschlagen
- weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02715

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 726 310 A (GEN PROBE INC) 14. August 1996 (1996-08-14) siehe Ansprüche und Beispiele	1-13
X	STRATAGENE CATALOGUE, Seiten 274-277, XP002085450 das ganze Dokument	1-13
X	DAY I N M ET AL: "Dried template DNA, Dried PCR oligonucleotides and mailing in 96-well:LDL receptor gene mutation screening" BIOTECHNIQUES, US, EATON PUBLISHING, NATICK, Bd. 18, Nr. 6, 1995, Seiten 981-984-984, XP002085449 ISSN: 0736-6205 das ganze Dokument	1-13

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

9. März 2000

22/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02715

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEBEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 674 253 A (DIAGNOSTICS PASTEUR) 25. September 1992 (1992-09-25) das ganze Dokument	1-13
X	SAMBROOK J. ET AL.,: "molecular cloning" 1987 , COLD SPRING HARBOUR PRESS, NEW YORK XP002132581 Seite 11.29 -Seite 11.30	1-3, 12
P, X	DE 197 16 154 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) siehe ganzes Dokument, besond. Ansprüche	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/02715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 726 310 A (GEN PROBE INC) 14 August 1996 (1996-08-14) see claims and examples ---	1-13
X	STRATAGENE CATALOGUE, pages 274-277, XP002085450 the whole document ---	1-13
X	DAY I N M ET AL: "Dried template DNA, Dried PCR oligonucleotides and mailing in 96-well:LDL receptor gene mutation screening" BIOTECHNIQUES, US, EATON PUBLISHING, NATICK, vol. 18, no. 6, 1995, pages 981-984-984, XP002085449 ISSN: 0736-6205 the whole document ---	1-13
dem		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 March 2000

Date of mailing of the international search report

22/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. n. Application No

PCT/DE 99/02715

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 674 253 A (DIAGNOSTICS PASTEUR) 25 September 1992 (1992-09-25) the whole document ----	1-13
X	SAMBROOK J. ET AL.: "molecular cloning" 1987, COLD SPRING HARBOUR PRESS, NEW YORK XP002132581 page 11.29 -page 11.30 ----	1-3, 12
P, X	DE 197 16 154 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 22 October 1998 (1998-10-22) see the whole document, particularly the claims -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/02715

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
EP 0726310	A 14-08-1996	US 5556771 A			17-09-1996
		AU 699590 B			10-12-1998
		AU 4916796 A			27-08-1996
		CA 2210584 A			15-08-1996
		JP 10503383 T			31-03-1998
		WO 9624664 A			15-08-1996
		US 5614387 A			25-03-1997
		US 5834254 A			10-11-1998
FR 2674253	A 25-09-1992	NONE			
DE 19716154	A 22-10-1998	AU 7758598 A			13-11-1998
		WO 9847490 A			29-10-1998
		EP 0975335 A			02-02-2000

Translation
5640

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

RECEIVED

JUN 15 2001

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

TECH CENTER 1600/2900

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 9961	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/02715	International filing date (day/month/year) 27 August 1999 (27.08.99)	Priority date (day/month/year) 28 August 1998 (28.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant KOEHLER, Thomas		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 March 2000 (27.03.00)	Date of completion of this report 05 December 2000 (05.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/02715

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

 the international application as originally filed. the description, pages 1-18, as originally filed.

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims, Nos. _____, as originally filed.

Nos. _____, as amended under Article 19.

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. 1-16, filed with the letter of 07 September 2000 (07.09.2000).

Nos. _____, filed with the letter of _____

 the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed.

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/02715

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	5, 10	YES
	Claims	1-4, 6-9, 11-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**1. This report makes reference to the following documents:**

- (A) Day I.N.M. et al.: Biotechniques, Vol. 18, No. 6, 1995, pages 981-984
- (B) EP-A-0 726 310
- (C) FR-A-2 674 253
- (D) Stratagene Catalogue, pages 274-277
- (E) Sambrook J. et al.: "Molecular cloning", 1987

2. The amendments submitted on 8 September 2000 do not introduce any subject matter that goes beyond the disclosure of the application as filed (PCT Article 34(2)(b)).

3. Novelty

- 3.1 The subject matter of Claim 1 is novel within the meaning of PCT Article 33(2) because the claimed nucleic-acid-coated reaction chambers are not disclosed in the prior art.
- 3.2 For the same reason, the subject matter of dependent Claims 2, 3 and 5 is also novel within the meaning of PCT Article 33(2).
- 3.3 The method for producing reaction chambers coated with nucleic acids (Claim 6 of the present application) and the use of the claimed reaction chambers for detecting selected nucleic acids in biological substances (Claim 15 of the

present application) are also novel (PCT Article 33(2)). The same applies to dependent Claims 7, 8, 10-14 and 16.

4. Inventive step

4.1 Document (A) discloses the use of DNA-coated vessels, the coating comprising samples of DNA that are to be examined (see pages 982 and 983, "dried template DNA" and "dried PCR oligonucleotides"). After drying, the adsorbed DNA molecules adhere to the inside of the reaction chamber which is being coated (see page 983).

The subject matter of Claim 1 differs from the disclosure of document (A) in that standard nucleic acids are used.

The problem addressed by the present invention can thus be regarded as that of allowing quantitative detection of nucleic acids using these reaction chambers.

This is only one of a number of obvious possibilities (use of defined quantities of standard DNA) from which a person skilled in the art would be able to choose in the circumstances without contributing an inventive step in order to solve the problem addressed.

Claim 1 therefore does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

4.2 Dependent Claims 2-4 do not include any additional features which, in conjunction with the features of the claim to which they refer back, meet the PCT requirement of inventive step.

Claims 2 and 3 merely define obvious possibilities from which a person skilled in the art would be able to choose in the circumstances without contributing an inventive step.

A person skilled in the art would regard it as routine procedure to use lambda DNA or a tDNA solution to dilute DNA

and RNA standards. The subject matter of Claim 4 therefore does not involve an inventive step and does not meet the requirement of PCT Article 33(3).

4.3 The use of lambda DNA that has been physically converted into smaller fragments by ultrasound is not described in the prior art. The small fragments function as adsorption agents and stabilisers. They can dissolve completely during the initial denaturing that normally occurs in polymerase chain reactions, thereby ensuring that the standard molecules are also completely desorbed from the inside wall of the reaction chamber. Claim 5 therefore involves an inventive step (PCT Article 33(3)).

4.4 For the reasons given in points 4.1 and 4.2 above, the subject matter of Claims 6-9 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

Claim 10 appears to involve an inventive step (see point 4.3 above).

4.5 Claims 11-16 do not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

The features of dependent Claims 12-14 have already been used for the same purpose in a similar method (cf. document (A), page 981). For a person skilled in the art, said features are therefore obvious.

Dependent Claims 11 and 15-16 relate to minor design modifications of the method and to uses of the claimed reaction chambers which do not go beyond the scope of what a person skilled in the art would normally do on the basis of routine deliberation. Hence the subject matter of Claims 11 and 15-16 does not involve an inventive step.

5. However, the following points should be noted:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/02715

According to the present invention, carrier nucleic acids improve adsorption during the lyophilisation process and increase the stability of the standard nucleic acids in the reaction chamber. However, the term "carrier nucleic acids" is not further defined in the claims and could be interpreted as referring to any of a variety of nucleic acid solutions.

Because of the broad definition of the claimed reaction chambers, the scope of protection of Claim 1 is not precisely defined and could include any type of vessel coated with a DNA solution.

6. For the reasons outlined below, the following search report citations are not prejudicial to the novelty of the claims:

Document (B) discloses the preparation of stable lyophilised enzyme compositions that can be used in a polymerase chain reaction. However, the nucleic acids are only added after the lyophilisation stage. Unlike in the present invention, the coating on the vessels is not a nucleic acid coating. The same is true of document (C). Documents (D) and (E) relate to the synthesis and isolation of oligonucleotides, the only feature which they have in common with the present invention being the fact that a lyophilisation process is carried out.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/02715

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box VI

The application validly claims the priority date of 28 August 1998. DE-A-197 16 154, which is cited in the search report as an intermediate document, is a German national application published on 22 October 1998. The content of the said document is therefore not regarded as prior art and has not been considered in the examination of novelty and inventive step.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/02715

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- 1.1 Claim 1 defines the invention in terms of the result which is to be achieved (coating with nucleic acids) and is therefore unclear (PCT Article 6).
- 1.2 The broad wording of Claim 1 creates a lack of clarity with regard to the scope of protection (PCT Article 6). The imprecisely defined scope of protection of Claim 1 could include any type of vessel coated with a DNA solution.